

25

懸濁液を4000rpm、4℃で5分間遠心分離した。
【0104】沈澱を蒸留水0.5ml中に懸濁した後、
SDプレート(0.667%(w/v) イースト・ナイ
トロジェン・ベース(ディフコ社製)、2%(w/v)
グルコース、1×アミノ酸混合液^{a)}を含む2%(w/v)

a) 1×アミノ酸混合液:

L-トリプトファン	0.002%(w/v)
ウラシル	0.02%(w/v)
L-ヒスチジン-塩酸塩	0.002%(w/v)
L-リジン-塩酸塩	0.003%(w/v)
L-アルギニン-塩酸塩	0.002%(w/v)
L-スレオニン	0.02%(w/v)
L-メチオニン	0.002%(w/v)
L-チロシン	0.003%(w/v)
L-フェニルアラニン	0.005%(w/v)
L-イソロイシン	0.003%(w/v)
L-バリン	0.015%(w/v)
硫酸アデニン	0.002%(w/v)
L-グルタミン酸	0.01%(w/v)
L-アスパラギン酸	0.01%(w/v)
L-セリン	0.375%(w/v)

実施例12. 酵母におけるPLA1遺伝子の発現

サッカロミセス・セレビジェKS58-2D/pCY339株、およびプラスミドを有していないKS58-2D株を、それぞれ20mlのYPD培地を含む100ml容の三角フラスコに植菌し、28℃、210rpmで3日間前培養した。前培養液0.5mlを完全合成培地^{b)}20mlを含む100ml容の三角フラスコに植菌し、引き続き28℃、210rpmで培養した。ただし、KS58-2D株の場合は、ロイシンを培地中に最終濃度0.003%(w/v)になるように添加した。経時的に培養液の一部を採取し、15000rpmで5分間遠心分離後、上清を回収して、ホスホリパーゼ活性測定用の試料とした。

【0106】b) 完全合成培地:

チアミン塩酸塩	400μg/リットル
ビオチン	2μg/リットル
ほう酸	500μg/リットル
硫酸銅	40μg/リットル
ヨウ化カリウム	100μg/リットル
塩化第二鉄	200μg/リットル

* 【0105】

* v) 寒天プレート) 上に菌体を塗抹した。このプレートを30℃で静置培養し、生育したコロニーを得た。この形質転換株をKS58-2D/pCY339と命名した。

26

※硫酸マンガン	400μg/リットル
モリブデン酸ナトリウム	200μg/リットル
硫酸亜鉛	400μg/リットル
硫酸アンモニウム	0.5%(w/v)
リン酸二カリウム	0.5%(w/v)
硫酸マグネシウム	0.05%(w/v)
塩化ナトリウム	0.01%(w/v)
塩化カルシウム	0.01%(w/v)
グルコース	2%(w/v)
ガラクトース	2%(w/v)
リン酸カリウム緩衝液(pH7.6)	0.2M
ウシ血清アルブミン	0.5%(w/v)
アミノ酸混合液	3倍濃度

試験例2

実施例12で調製した試料のホスホリパーゼ活性を、試験例1に記載した方法により測定した。各試料のホスホリパーゼ活性は表2に記載する通りであった。

【0107】

【表2】

試料	培養日数(日)					
	3	5	7	10	13	17
KS58-2D(対照)	0	0	0	0	0	0
KS58-2D/pCY339	3.9	6.2	7.7	10.3	12.1	13.8

単位: U/ml

実施例13. アスペルギルス・オリゼでの発現

(1) 発現プラスミドベクターの構築

実施例7で調製したプラスミドpRAV885 3 μ gを制限酵素Sac Iで消化し、エタノール沈澱を行ってDNAを回収し、さらに制限酵素Bam HIで消化後、エタノール沈澱を行ってDNAを回収した。このDNAをアガロースゲル電気泳動し、0.94 kbpに相当するバンド部分のゲルを切り出し、DNAを回収した。この0.94 kbp断片の末端を、DNAブランディングキットを用いて平滑化した。その後、フェノール・クロロホルム抽出を2回、エタノール沈澱を1回行ってDNAを回収した。

【0108】一方、アスペルギルス・オリゼ用発現プラスミドベクター pTAex3 [Fujii, T., et al. (1995) Biosci. Biotech. Biochem. 59, 1869-1874参照] 1.5 μ gを制限酵素Eco RIで消化し、エタノール沈澱を行ってDNAを回収した。このDNAの末端を、DNAブランディングキットを用いて平滑化した後、フェノール・クロロホルム抽出を2回、エタノール沈澱を1回行ってDNAを回収した。さらに、このDNAの末端を仔ウシ小腸由来アルカリホスファターゼ(宝酒造(株)社製)30単位で脱リン酸化した後、フェノール・クロロホルム抽出を2回、エタノール沈澱を1回行ってDNAを回収した。

【0109】このEco RI消化したpTAex3 DNA 1 μ gと、pRAV885より得た0.94 kbpのBam HI-Sac I断片 0.4 μ gとを、DNAライゲーションキットを用いて連結した。この連結反応液を用いてコンピテント大腸菌 E. coli HB 101を形質転換し、100 μ g/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地(1% バクト・トリプトン、0.5% バクト・イーストエキストラクト、0.5% 塩化ナトリウム、1.5% バクト・アガー)上で生育したコロニーを選択した。このアンピシリン耐性株の中から、その保持するプラスミドDNAを制限酵素Eco RIおよびBgl IIで消化した際に5.5 kbp、2.3 kbpおよび0.7 kbpの3本の断片を生成するものを選択した。この株を大量培養し、PLA1のアスペルギルス・オリゼ用発現プラスミドベクターpAAPを調製した。

【0110】(2) アスペルギルス・オリゼの形質転換 上記(1)で調製した発現ベクターpAAPのアスペルギルス・オリゼへの導入は、五味らの方法[Gomi, K., et al. (1987) Agric. Biol. Chem. 51, 2549-2555参照]に基づいて行なった。すなわち、まずDP培地(2% デキストリン、1% ポリペプトン、0.5% リン酸1カリウム、0.05% 硫酸マグネシウム)を80 ml仕込んだ500 ml容三角フラスコに、アスペルギルス・オリゼ M-2-3株[醸造研究所より分譲: 前出Gomi, K., et al.参照]を1白金耳接種し、30℃

で20から40時間振盪培養した。得られたベレット状の菌体をガラスフィルター3G1(ハリオ(株)社製)で濾過して回収し、滅菌水で洗浄後、水切りして50 mlのコニカルチューブに入れた。この菌体に、フィルター滅菌したプロトプラスト化溶液(5 mg/ml ノボザイム234(ノボ社製)、5 mg/ml セルラーゼR-10(生化学工業(株)社製)、0.8 M塩化ナトリウム、10 mM リン酸緩衝液(pH6.0))を10 ml加えて、30℃、100 rpmで3時間振盪した。この反応液をガラスフィルター3G3(ハリオ(株)社製)で濾過し、濾液を0.8 M塩化ナトリウム溶液で2回洗浄後、溶液I(0.8 M塩化ナトリウム、10 mM 塩化カルシウム、10 mM トリス-塩酸(pH7.5))で洗浄し、2000 rpmで5分間遠心分離して、沈澱したプロトプラストを得た。

【0111】このプロトプラストを 2.5×10^8 /mlとなるように最終容量の4/5量の溶液Iに懸濁し、これに1/5量の溶液II(40% ポリエチレングリコール4000、50 mM 塩化カルシウム、50 mM トリス-塩酸(pH7.5))と1/100量のジメチルスルホキシドを加えた。このプロトプラスト懸濁液0.2 mlにpAAP DNA 10 μ gを添加して、30分氷冷した。次に、1 mlの溶液IIを加えてよく混合し、20分間室温で放置した後、10 mlの溶液Iを加え、2000 rpmで5分間遠心分離した。沈澱したプロトプラストを適量の溶液Iに懸濁し、0.8 M塩化ナトリウムを含むを含むCzapek-Dox寒天培地(0.2% 硝酸ナトリウム、0.1% リン酸2カリウム、0.05% 硫酸マグネシウム、0.05% 塩酸カリウム、0.001% 硫酸第1鉄、3% シュークロース、2% 寒天)に塗抹した。アスペルギルス・オリゼ M-2-3株はアルギニン要求性であることから、通常は最少培地であるCzapek-Dox培地で生育できず、pAAPが導入された株のみが生育できる。Czapek-Doxplate上で生育した形質転換体は、さらにCzapek-Dox培地で3回植継ぎ、安定生産株アスペルギルス・オリゼ M-2-3/pAAP株を取得した。

【0112】(3) 形質転換体の培養およびPLA1活性の確認

スラント上に生育したアスペルギルス・オリゼ M-2-3/pAAP株より、胞子および菌糸を1白金耳かき取り、DPY培地(2% デキストリン、1% ポリペプトン、0.5% イーストエキストラクト、0.5% リン酸1カリウム、0.05% 硫酸マグネシウム、pH6.5)を80 ml仕込んだ500 ml容三角フラスコに植菌した。これを26℃、210 rpmの条件で培養し、培養開始7日目の培養上清のPLA1活性を、試験例1に記載した方法で測定した結果、少なくとも30 U/mlの活性が認められた。この分泌生産量は、プラスミドを保持しないアスペルギルス・オリゼ M-2-

3株の300倍以上に相当し、PLA1遺伝子の過剰発現によりPLA1の分泌生産量が大幅に増大したことを示した。

【0113】このアスペルギルス・オリゼ M-2-3/pAAP株の培養上清 10μlを試料として、10-20%のグラジエントゲルを用いたSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を実施した。泳動終了後、ゲル中のタンパク質を転写装置（ザルトプロットII-S：ザルトリウス社製）を用いてニトロセルロース膜（アマシャム社製）に転写した。このニトロセルロース膜について、抗PLA1ウサギIgG抗体を一次抗体、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGヤギ抗体（バイオラッド社製）を二次抗体とするウエスタンブロット解析を実施した結果、多量のPLA1が検出され、アスペルギルス・オリゼ M-2-3/pAAP株においてPLA1が大量に産生されていることが確認された。

【0114】

【発明の効果】 以上のごとく、本発明の方法によって製造される組換えタンパク質は、優れたホスホリパーゼ活性を有する。本発明により、組換えPLA1の工業的規模の製造を高収率・高純度で行うことが可能となった。

【図面の簡単な説明】

【図1】プラスミドpRAV12の制限酵素地図。

配列

ATG TTT AGT CTC GCG CGA TTG GGG ACC GTT GCA GGT CTA TTT TTA CTG	48
Met Phe Ser Leu Ala Arg Leu Gly Thr Val Ala Gly Leu Phe Leu Leu	
-26 -25 -20 -15	
GCT CAG GCT GCC CCG GCT TCA CTG CGC AGA GAT GTC AGC TCT TCC CTT	96
Ala Gln Ala Ala Pro Ala Ser Leu Arg Arg Asp Val Ser Ser Ser Leu	
-10 -5 1 5	
CTC AAT AAC CTG GAT CTC TTT GCA CAG TAC AGC GCC GCC GCA TAC TGT	144
Leu Asn Asn Leu Asp Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys	
10 15 20	
GAT GAG AAC CTG AAC TCT ACG GGG ACC AAG TTG ACA TGC TCT GTT GGC	192
Asp Glu Asn Leu Asn Ser Thr Gly Thr Lys Leu Thr Cys Ser Val Gly	
25 30 35	
AAC TGT CCT TTG GTA GAA GCG GCC TCT ACC CAA TCA TTG GAT GAA TTC	240
Asn Cys Pro Leu Val Glu Ala Ala Ser Thr Gln Ser Leu Asp Glu Phe	
40 45 50	
AAC GAA TCG TCA TCC TAC GGC AAC CCC GCC GGG TAC CTC GCC GCT GAT	288
Asn Glu Ser Ser Ser Tyr Gly Asn Pro Ala Gly Tyr Leu Ala Ala Asp	
55 60 65 70	
GAG ACT AAC AAG CTC CTA GTC CTG TCC TTC CGG GGT AGC GCT GAC TTG	336
Glu Thr Asn Lys Leu Leu Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Ala Asp Leu	
75 80 85	
GCC AAT TGG GTC GCC AAC CTG AAT TTT GGT CTC GAG GAT GCC AGC GAT	384
Ala Asn Trp Val Ala Asn Leu Asn Phe Gly Leu Glu Asp Ala Ser Asp	
90 95 100	
CTG TGT TCT GGG TGC GAA GTG CAC AGC GGC TTC TGG AAG GCA TGG AGT	432

* 【図2】プラスミドpRAV43の制限酵素地図。

【図3】プラスミドpRAV885の制限酵素地図。

【図4】プラスミドpRAV825の構築図。

【図5】プラスミドpCY339の構築図。

【図6】プラスミドpAAPの構築図。

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：888

配列の種類：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の型：cDNA to mRNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

起源

生物名：アスペルギルス・オリゼ (Aspergillus oryzae)

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

位置：1..885

特徴を表す記号：mat_peptide

位置：79..885

特徴を表す記号：sig_peptide

* 位置：1..78

(17)

特開平10-155493

31 32

Leu Cys Ser Gly Cys Glu Val His Ser Gly Phe Trp Lys Ala Trp Ser

105 110 115

GAA ATC GCC GAC ACC ATC ACT TCC AAA GTG GAA TCA GCT TTG TCG GAT 480

Glu Ile Ala Asp Thr Ile Thr Ser Lys Val Glu Ser Ala Leu Ser Asp

120 125 130

CAT TCC GAT TAT TCC TTG GTC TTG ACC GGA CAT AGT TAC GGC GCT GCG 528

His Ser Asp Tyr Ser Leu Val Leu Thr Gly His Ser Tyr Gly Ala Ala

135 140 145 150

CTG GCA GCC CTC GCA GCG ACT GCT CTG CGG AAC TCC GGC CAT AGT GTT 576

Leu Ala Ala Leu Ala Ala Thr Ala Leu Arg Asn Ser Gly His Ser Val

155 160 165

GAG CTG TAC AAC TAC GGT CAA CCT CGA CTT GGA AAC GAG GCA TTG GCA 624

Glu Leu Tyr Asn Tyr Gly Gln Pro Arg Leu Gly Asn Glu Ala Leu Ala

170 175 180

ACA TAT ATC ACG GAC CAA AAC AAG GGT GGC AAC TAT CGC GTT ACG CAC 672

Thr Tyr Ile Thr Asp Gln Asn Lys Gly Gly Asn Tyr Arg Val Thr His

185 190 195

ACT AAT GAT ATT GTG CCT AAA CTG CCA CCC ACG CTG CTC GGG TAT CAC 720

Thr Asn Asp Ile Val Pro Lys Leu Pro Pro Thr Leu Leu Gly Tyr His

200 205 210

CAC TTC AGC CCA GAG TAC TAT ATC AGC AGC GCC GAC GAG GCA ACG GTG 768

His Phe Ser Pro Glu Tyr Tyr Ile Ser Ser Ala Asp Glu Ala Thr Val

215 220 225 230

ACC ACC ACT GAT GTG ACT GAG GTT ACG GGA ATC GAT GCT ACG GGC GGT 816

Thr Thr Thr Asp Val Thr Glu Val Thr Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly

235 240 245

AAT GAT GGA ACC GAC GGA ACT AGC ATC GAT GCT CAT CGG TGG TAC TTT 864

Asn Asp Gly Thr Asp Gly Thr Ser Ile Asp Ala His Arg Trp Tyr Phe

250 255 260

ATT TAT ATT AGC GAA TGT TCA TAG 888

Ile Tyr Ile Ser Glu Cys Ser

265

配列番号: 2

配列の長さ: 295

配列の種類: アミノ酸

* トポロジー: 直鎖状

配列の型: 蛋白質

*

配列

Met Phe Ser Leu Ala Arg Leu Gly Thr Val Ala Gly Leu Phe Leu Leu

-26 -25 -20 -15

Ala Gln Ala Ala Pro Ala Ser Leu Arg Arg Asp Val Ser Ser Ser Leu

-10 -5 1 5

Leu Asn Asn Leu Asp Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Tyr Cys

10 15 20

Asp Glu Asn Leu Asn Ser Thr Gly Thr Lys Leu Thr Cys Ser Val Gly

25 30 35

Asn Cys Pro Leu Val Glu Ala Ala Ser Thr Gln Ser Leu Asp Glu Phe

40 45 50

Asn Glu Ser Ser Ser Tyr Gly Asn Pro Ala Gly Tyr Leu Ala Ala Asp

55 60 65 70

Glu Thr Asn Lys Leu Leu Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Ala Asp Leu

75 80 85

(18)

特開平10-155493

33 34
 Ala Asn Trp Val Ala Asn Leu Asn Phe Gly Leu Glu Asp Ala Ser Asp
 90 95 100
 Leu Cys Ser Gly Cys Glu Val His Ser Gly Phe Trp Lys Ala Trp Ser
 105 110 115
 Glu Ile Ala Asp Thr Ile Thr Ser Lys Val Glu Ser Ala Leu Ser Asp
 120 125 130
 His Ser Asp Tyr Ser Leu Val Leu Thr Gly His Ser Tyr Gly Ala Ala
 135 140 145 150
 Leu Ala Ala Leu Ala Ala Thr Ala Leu Arg Asn Ser Gly His Ser Val
 155 160 165
 Glu Leu Tyr Asn Tyr Gly Gln Pro Arg Leu Gly Asn Glu Ala Leu Ala
 170 175 180
 Thr Tyr Ile Thr Asp Gln Asn Lys Gly Gly Asn Tyr Arg Val Thr His
 185 190 195
 Thr Asn Asp Ile Val Pro Lys Leu Pro Pro Thr Leu Leu Gly Tyr His
 200 205 210
 His Phe Ser Pro Glu Tyr Tyr Ile Ser Ser Ala Asp Glu Ala Thr Val
 215 220 225 230
 Thr Thr Thr Asp Val Thr Glu Val Thr Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly
 235 240 245
 Asn Asp Gly Thr Asp Gly Thr Ser Ile Asp Ala His Arg Trp Tyr Phe
 250 255 260
 Ile Tyr Ile Ser Glu Cys Ser
 265

配列番号: 3
 配列の長さ: 15
 配列の型: アミノ酸
 鎖の数: 一本鎖

* トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: タンパク質
 フラグメント型: 中間部フラグメント

*

配列

Gly Gly Asn Tyr Arg Val Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro Lys
 1 5 10 15

配列番号: 4
 配列の長さ: 12
 配列の型: アミノ酸
 鎖の数: 一本鎖
 トポロジー: 直鎖状

※配列の長さ: 39
 配列の型: アミノ酸
 鎖の数: 一本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: タンパク質
 フラグメント型: 中間部フラグメント

配列の種類: タンパク質
 フラグメント型: 中間部フラグメント
 配列

Ala Trp Ser Glu Ile Ala Asp Thr Ile Thr Ser Lys 40
 1 5 10

配列番号: 5

※

配列

Leu Thr Xaa Ser Val Gly Asn Xaa Pro Leu Val Glu Ala Ala Ser Thr
 1 5 10 15
 Gln Ser Leu Asp Glu Phe Asn Glu Ser Ser Ser Tyr Gly Asn Pro Ala
 20 25 30
 Gly Tyr Leu Ala Ala Xaa Glu
 35

配列番号: 6

★50★配列の長さ: 26

	35	(19)	特開平10-155493
配列の型: アミノ酸			36
鎖の数: 一本鎖		* 配列の種類: タンパク質	
トポロジー: 直鎖状		フラグメント型: 中間部フラグメント	
		*	
配列			
Asp Val Ser Ser Ser Leu Leu Asn Asn Leu Asp Leu Phe Ala Gln Tyr			
1 5 10 15			
Ser Ala Ala Ala Tyr Xaa Asp Glu Asn Leu			
20 25			
配列番号: 7		※トポロジー: 直鎖状	
配列の長さ: 30		10 配列の種類: タンパク質	
配列の型: アミノ酸		フラグメント型: 中間部フラグメント	
鎖の数: 一本鎖		※	
配列			
Val Glu Ser Ala Leu Ser Asp His Ser Asp Tyr Ser Leu Val Leu Thr			
1 5 10 15			
Gly His Ser Tyr Gly Ala Ala Leu Xaa Xaa Leu Xaa Ala Thr			
20 25 30			
配列番号: 8		★トポロジー: 直鎖状	
配列の長さ: 17		配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)	
配列の型: 核酸		20 ハイボセティカル: No	
鎖の数: 一本鎖		★ アンチセンス: No	
配列			
GAYYTNTTYG CNCARTA			17
配列番号: 9		☆トポロジー: 直鎖状	
配列の長さ: 16		配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)	
配列の型: 核酸		ハイボセティカル: No	
鎖の数: 一本鎖		☆ アンチセンス: Yes	
配列			
SWTCRTTTRAA YTCRTC			16
配列番号: 10		30 ◆トポロジー: 直鎖状	
配列の長さ: 20		配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)	
配列の型: 核酸		ハイボセティカル: No	
鎖の数: 一本鎖		◆ アンチセンス: No	
配列			
CGTCCTGCAC GGCATTCAAA			20
配列番号: 11		*トポロジー: 直鎖状	
配列の長さ: 20		配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)	
配列の型: 核酸		ハイボセティカル: No	
鎖の数: 一本鎖		* アンチセンス: Yes	
配列			
TCCCTTCTCA AAGCCAGAAT			20
配列番号: 12		※トポロジー: 直鎖状	
配列の長さ: 28		配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)	
配列の型: 核酸		ハイボセティカル: No	
鎖の数: 一本鎖		※ アンチセンス: No	
配列			
GGGTCGACAT GAAAGCATTC ACCAGTTT			28
配列番号: 13		★鎖の数: 一本鎖	
配列の長さ: 40		トポロジー: 直鎖状	
配列の型: 核酸		★50 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)	

37

38

ハイボセティカル: No

* * アンチセンス: Yes

配列

AGAAGGGAAG AGCTGACATC AATCTTGTG ACACGAAGCT

40

配列番号: 14

※トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 40

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列の型: 核酸

ハイボセティカル: No

鎖の数: 一本鎖

※ アンチセンス: No

配列

AGCTTCGTGT CAACAAGATT GATGTCAGCT CTT
CCCTTCT

40

配列番号: 15

★トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 29

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列の型: 核酸

ハイボセティカル: No

鎖の数: 一本鎖

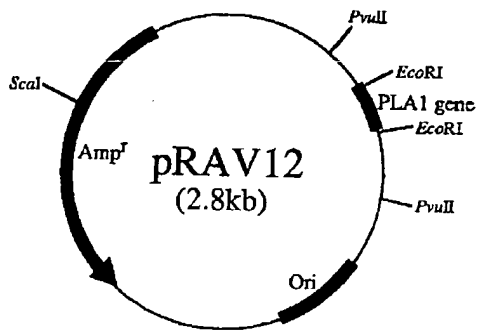
★ アンチセンス: Yes

配列

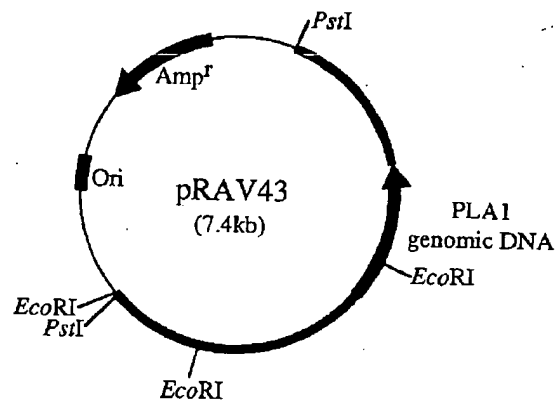
CCCAAGCTTC TATGAACATT CGCTAATAT

29

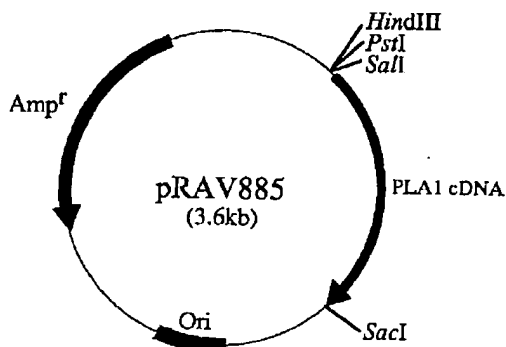
【図1】



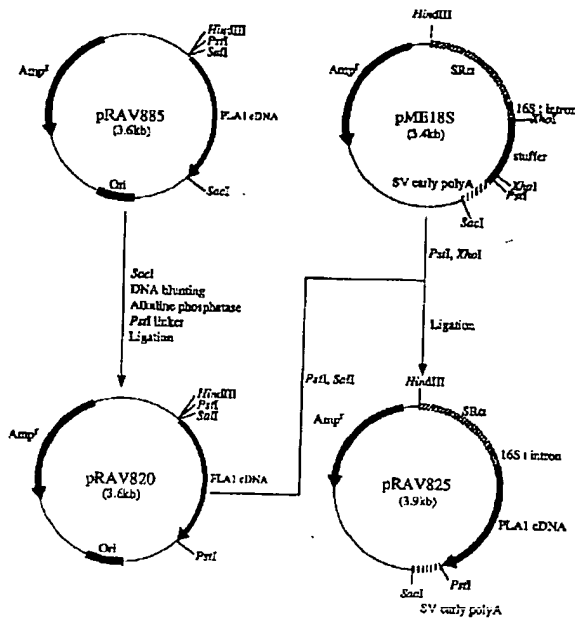
【図2】



【図3】



【図4】



【図6】

